

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|--|--|--|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/04, 1/37 | | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 98/04735 (43) Date de publication internationale: 5 février 1998 (05.02.98) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01415 (22) Date de dépôt international: 29 juillet 1997 (29.07.97) | | (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (30) Données relatives à la priorité: 96/09523 29 juillet 1996 (29.07.96) FR | | Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> | |
| (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy L'Etoile (FR) | | | |
| (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): ORENGA, Sylvain [FR/FR]; Saint-André-le-Bas, F-01160 Neuville sur Ain (FR) | | | |
| (74) Mandataire: TONNELLIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR) | | | |

(54) Title: **METHOD FOR DEMONSTRATING AN ENZYMATIC ACTIVITY OF MICRO-ORGANISMS**

(54) Titre: **PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE DE MICROORGANISMES**

(57) Abstract

The method consists in the use of one compound of formula: X-NH-R in which X represents one 5-bromoindole-3-yl group and R represents the acyl radical of one amino acid selected between leucine and alanine, as tracer for demonstrating, by the formation of a coloured product, a peptidase activity in a culture of micro-organisms.

(57) Abrégé

Utilisation d'au moins un composé de formule: X-NH-R dans laquelle X représente un groupe 5-bromoindole-3-yl et R représente le reste acyle d'un acide aminé choisi parmi la leucine et l'alanine, comme agent révélateur permettant de mettre une évidence, par formation d'un produit coloré, une activité de peptidase dans une culture de microorganismes.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lithuanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakhstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LJ | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

Procédé de mise en évidence d'une activité enzymatique de microorganismes

La présente invention concerne un procédé de mise en évidence d'une activité enzymatique de microorganismes. Un tel procédé peut être utilisé pour l'identification de microorganismes exprimant ou n'exprimant pas cette activité enzymatique.

La détection et l'identification des microorganismes sont très importantes notamment en médecine, dans l'industrie agro-alimentaire, pour le contrôle de l'environnement (par exemple le contrôle de l'eau...). Les microorganismes peuvent être recherchés pour leur pathogénicité, comme indicateurs de contamination, ou encore pour le contrôle de procédés de fabrication.

Les techniques de détection et d'identification de microorganismes sont actuellement basées sur la recherche de séquence nucléotidiques caractéristiques, la recherche d'anticorps ou d'anticorps, la culture, en milieu sélectif ou non sélectif, ou encore sur la recherche d'activités métaboliques et notamment enzymatiques (par exemple activités d'osidases, d'estérases, de peptidases, d'oxydases, etc.).

Le plus souvent, les procédés de détection et d'identification des microorganismes associent plusieurs de ces techniques. La culture est ainsi utilisée pour multiplier et sélectionner les microorganismes recherchés. Afin de simplifier leur détection, il a été proposé de mettre en évidence des activités biochimiques en introduisant des molécules produisant une coloration ou une fluorescence, directement dans le milieu de culture. De tels milieux sont appelés milieux de détection. Les activités biochimiques peuvent être mises en évidence par diverses méthodes telles

- 2 -

que :

- la modification physico-chimique du milieu : changement de pH révélé à l'aide d'un indicateur coloré ou fluorescent (méthyl-umbelliférone),
5 - le changement du potentiel redox révélé à l'aide d'un indicateur coloré (sel de tétrazolium) ou fluorescent,
- la réaction d'une molécule produite par les micro-organismes avec un composé présent dans le milieu, conduisant à une coloration,
- 10 - l'hydrolyse de molécules libérant un composé coloré ou fluorescent (naphtol, coumarine).

Les hydrolyses détectées sont en général le résultat de l'action d'une enzyme produite par le microorganisme sur un substrat enzymatique naturel ou synthétique. Ces activités enzymatiques sont par exemple celles des enzymes suivantes : estérases (par exemple lipases, phosphatasées), osidases (β -galactosidase, β -glucuronidase, N-acétyl-hexosaminidase), peptidases (alanine-aminopeptidase, trypsinase, gélatinase), DNAses, décarboxylases, désaminases, uréases, tryptophanases, 20 oxydases, catalases, etc.

On sait que les milieux gélifiés sont particulièrement bien adaptés à la culture et à l'isolement de microorganismes à partir d'un prélèvement, ainsi qu'à la détection de microorganismes "cibles" au sein d'un mélange de 25 microorganismes. Sur ces milieux, les microorganismes forment des colonies détectables à l'œil nu, et il est hautement souhaitable que les produits des activités biochimiques recherchées restent localisés sur leur site de production. Cela permet en effet de distinguer une colonie de ses voisines si elles n'expriment pas les mêmes activités. On peut ainsi utiliser diverses méthodes détectant par exemple 30 des changements de pH (FR-A-2 671 100), des activités

- 3 -

d'estérases (FR-2 457 323), des activités d'osidases (FR-A-2 684 110) etc. Il est évidemment possible d'utiliser conjointement plusieurs de ces méthodes, afin de mettre en évidence plusieurs espèces ou souches, et/ou d'accroître la 5 sensibilité et/ou la spécificité de la détection.

On ne dispose pas actuellement de moyen, adapté aux milieux gélifiés, pour mettre en évidence des activités de L-Alanine-aminopeptidases, D-Alanine-aminopeptidases et L-Leucine-aminopeptidases de microorganismes. En effet, les 10 substrats enzymatiques utilisés jusqu'à présent libèrent des molécules colorées ou fluorescentes qui diffusent dans les milieux gélifiés et/ou qui ne sont révélées que par irradiation U.V. (cas de la naphtylamine ou de l'aminocoumarine) et/ou après action de réactifs (cas de la 15 naphtylamine), ou dont la coloration est peu contrastée dans les milieux réactionnels utilisés en microbiologie (cas de la nitroaniline).

On sait que la L-Leucine-aminopeptidase a été mise en évidence dans des coupes histologiques de mammifères grâce 20 à un substrat enzymatique, la L-Leucine-3-(5-Bromo-indolamine), par abréviation L-Leu-BIA, qui produit après hydrolyse un composé coloré ; voir Pearson et al., 1963, Lab. Invest., 12 : 712. En 1967, Yarborough et al., J. Reticuloendoth. Soc., 4 : 390 ont repris la technique de 25 Pearson et al. dans des applications similaires (coupes histologiques). Ils ont précisé que l'ajout d'un mélange de ferri- et ferro-cyanure de potassium ou de sulfate de cuivre inhibe la réaction.

En 1975 Lojda et Havránková, Histochemistry, 43 : 30 355 proposèrent d'améliorer la méthode utilisant le substrat L-Leu-BIA par l'addition d'un mélange de sel de tétrazolium et de phénazine méthosulfate, la réaction colorée observée

- 4 -

provenant alors de la réduction du sel de tétrazolium en formazan.

Lors des travaux ayant conduit à la présente invention, on a recherché s'il était possible d'utiliser la 5 L-Leu-BIA comme substrat enzymatique dans la détection de microorganismes cultivés notamment sur milieux gélifiés. Lors d'essais préliminaires, on a ajouté de la L-Leu-BIA dans le milieu qui est décrit à l'exemple 1 ci-après. Ce milieu est couramment utilisé pour la recherche d'osidases.

10 Il n'a pas été possible de mettre en évidence une activité de peptidase, quel que soit le microorganisme cultivé dans ce milieu (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*).

15 En revanche, si l'on ajoute dans ce même milieu de la L-Leucine-7-amino-4-méthyl-coumarine (L-Leu-AMC), une fluorescence est détectée avec certains de ces mêmes microorganismes. De même dans ce milieu, avec des substrats 20 d'osidases (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside et 6-Chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide), on peut détecter les 25 activités de β -galactosidase et de β -glucuronidase des microorganismes. L'ajout des réactifs proposés par Lojda et Havráneková s'est traduit par une inhibition plus ou moins complète de la croissance des microorganismes sans permettre la révélation d'une activité de peptidase avec la L-Leu-BIA.

De même, avec le milieu utilisé à l'exemple 2 ci-après, on n'a pas pu mettre en évidence une activité de peptidase avec L-Leu-BIA, alors que le substrat L-Leu-AMC permet de détecter cette activité dans le même milieu.

30 On a maintenant découvert que l'absence de résultats avec les dérivés de BIA n'était pas due à une incompatibilité

- 5 -

avec les microorganismes ou à une inhibition de leur multiplication en culture, mais était due essentiellement à des conditions de milieu. On a en effet découvert qu'il était possible de révéler l'activité de peptidase de 5 microorganismes avec la L-Leu-BIA, en utilisant d'autres milieux de culture. Les raisons pour lesquelles certains milieux sont utilisables, et d'autres non, ne sont pas connues. Néanmoins, il est possible de déterminer et de mettre au point, par de simples expériences de routine, 10 semblables à celles décrites dans la partie expérimentale ci-après, les milieux et/ou ingrédients qui conviennent ou qui ne conviennent pas. L'invention a donc d'abord consisté notamment à rechercher, et à montrer qu'il était possible de trouver, des milieux de culture dans lesquels les substrats 15 de peptidases dérivés de la 5-bromoindolamine mentionnés ci-dessus sont utilisables pour mettre en évidence les activités enzymatiques correspondantes dans une culture de microorganismes.

On a ainsi découvert notamment que le milieu suivant 20 est utilisable :

- Extrait de levure 0,5-25 g/l
- Peptone de gélatine 0,5-25 g/l
- NaCl 0-50 g/l

et éventuellement :

- 25 - Agent régulateur de pH, q.s.p. pH = 3 à 9

et/ou :

- Agent gélifiant 5-35 g/l

Le pH choisi est un pH qui convient pour le 30 microorganisme étudié. Dans le cas d'un milieu gélifié, le pH est de préférence de 5 à 9. On peut ajuster le pH, par

- 6 -

exemple, avec de l'acide chlorhydrique ou du carbonate de sodium.

Si on ajoute à un tel milieu de la L-Leu-BIA, et si on ensemence avec des microorganismes, on obtient après 5 culture des colonies brunes ou incolores suivant que les microorganismes expriment ou non une activité de L-Leucine-aminopeptidase.

Des résultats comparables ont été obtenus avec les substrats L-Ala-BIA et D-Ala-BIA.

10 L'invention a donc pour objet l'utilisation d'au moins un composé de formule :



dans laquelle X représente un groupe 5-bromoindole-3-yle et R représente le reste acyle d'un acide aminé choisi parmi la 15 leucine et lalanine,

comme agent révélateur permettant de mettre en évidence, par formation d'un produit coloré, une activité de peptidase dans une culture de microorganismes.

En particulier le groupe R représente un reste acyle 20 de L-Leu, L-Ala ou D-Ala.

Les substrats dont l'utilisation fait l'objet de la présente demande n'inhibent pas la multiplication des microorganismes dans les milieux de culture appropriés. On peut donc utiliser l'agent révélateur en l'ajoutant au milieu 25 de culture des microorganismes, avant le début de la culture ou en début de culture.

L'un des avantages importants des agents révélateurs utilisés selon l'invention est qu'en présence de l'activité de peptidase recherchée, ils donnent des produits colorés qui 30 ne diffusent pas dans le milieu gélifié.

Ils peuvent donc être utilisés en milieu gélifié. Ils peuvent aussi, bien entendu, être utilisés en milieu

liquide.

Selon un mode de réalisation particulier, on peut ajouter à la culture, en outre, au moins un autre agent révélateur permettant de mettre en évidence, par formation 5 d'un produit coloré ou fluorescent, une activité enzymatique généralement différente de celle qui est mise en évidence à l'aide des composés de formule X-NH-R tels que définis ci-dessus. Il peut s'agir par exemple d'une activité d'estérase, d'osidase ou de peptidase. On peut ainsi obtenir des 10 informations supplémentaires, en liaison avec une absence de coloration (ou de fluorescence) ou en liaison avec une coloration modifiée par rapport à la coloration obtenue avec un seul substrat enzymatique. L'autre agent révélateur choisi aura des propriétés différentes de celles des dérivés de 15 BIA : par exemple, on choisira un autre agent révélateur capable de donner un produit réactionnel ayant une couleur différente de la couleur brune obtenue avec les dérivés de BIA. L'autre agent révélateur (ou second agent révélateur) permettra donc de révéler, grâce à sa couleur propre, ou 20 grâce à sa fluorescence, la présence d'une activité enzymatique dont il est spécifique. Si l'activité de peptidase révélable par les dérivés de BIA est également présente, on obtiendra une coloration modifiée, différente de ladite couleur brune et différente aussi de ladite couleur 25 propre donnée par le second agent révélateur. Des exemples d'utilisation de plusieurs substrats, ainsi que les informations qui peuvent en ressortir, sont donnés ci-après dans la partie expérimentale. Bien entendu, les résultats peuvent varier avec chaque espèce ou souche de microorganisme 30 étudié.

Chaque cas susceptible d'intérêt doit donc faire l'objet d'études préalables selon des expériences de routine.

- 8 -

Les dérivés servant à mettre en évidence des activités enzymatiques différentes, et utilisables comme autres agents révélateurs, sont notamment des dérivés d'indoxyle, de coumarine, de résorufine, de naphtol, de 5 naphtylamine, de nitrophénol, de nitroaniline, de rhodamine, d'hydroxyquinoléine, de fluorescéine, etc.

Parmi ces dérivés qui peuvent être utilisés en association avec les dérivés de BIA, on peut citer notamment le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide, le 6-chloro-10 3-indolyl- β -D-glucoside, la L-alanine-7-amino-4-méthyl-coumarine, le 4-méthyl-umbelliféryl-N-acétyl- β -D-galactosaminide, le résorufine- β -D-galactoside, le sulfate de β -naphtyle, le naphtol AS-BI β -D-galactoside, le L-alanine β -naphtylamide, l' α -nitrophénol- β -D-galactoside, le carboxybenzoyle-L-arginine-p-nitroanilide, la rhodamine 110 bis-(L-leucine amide), 15 l'hydroxyquinoléine- β -D-glucoside, et le diacétate de fluorescéine.

L'invention a également pour objet un procédé de mise en évidence d'une activité de peptidase dans une culture 20 de microorganisme, dans lequel on ajoute au milieu de culture desdits microorganismes un agent révélateur permettant de mettre en évidence ladite activité par formation d'un produit coloré, caractérisé par le fait que ledit agent révélateur comprend au moins un composé de formule :

25 X-NH-R,

dans laquelle X et R sont définis comme ci-dessus.

On peut ajouter le composé X-NH-R avant le début de la culture, ou en cours de culture, ou même en fin de culture. La mise en oeuvre du procédé de l'invention implique donc de cultiver les microorganismes étudiés, étant entendu que l'on peut effectuer cette culture avant ou après

- 9 -

l'addition du composé X-NH-R, et que l'on peut également effectuer cette addition en cours de culture. Bien entendu, on effectue la culture proprement dite par incubation d'un milieu de culture approprié dans des conditions permettant la multiplication des microorganismes étudiés. Les compositions des milieux de culture et les conditions de culture qui conviennent sont connues ou peuvent être déterminées par des expériences de routine.

L'invention a également pour objet un milieu de culture de microorganismes contenant, outre les ingrédients nécessaires à la culture desdits microorganismes, au moins un composé de formule X-NH-R.

Les dérivés de formule X-NH-R sont utilisés à des concentrations suffisantes pour donner des réactions colorées observables. Ces concentrations, qui peuvent être déterminées par expériences de routine, peuvent varier généralement de 25 à 2000 mg par litre de milieu de culture.

Les caractéristiques et avantages de l'invention sont illustrés par les exemples suivants.

20

EXEMPLES

Exemple 1

25

Le milieu de culture contient, outre de l'eau :

- Peptone de viande * 15 g/l
- Peptone de caséine ** 3 g/l
- NaCl 5 g/l
- 30 - Tampon Tris 0,5 g/l
- Na₂HPO₄ 1 g/l

- 10 -

- Citrate de sodium..... 1 g/l
 - Glucose 1 g/l
 - Pyruvate de sodium 2 g/l
 - Agar 13 g/l
- 5 * commercialisé par : D.I.F.C.O.
- ** commercialisé par : D.I.F.C.O.

A ce milieu, on ajoute soit de la L-Ala-BIA, soit de la L-Leu-BIA, soit de la L-Ala-AMC soit de la L-Leu-AMC, à des concentrations de 200 mg/l. On ensemence les différents milieux obtenus, répartis dans des boîtes de Petri, avec des microorganismes. Les boîtes ont été mises en incubation à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement à la lumière ambiante et sous lampe U.V. (longueur d'onde = 365 nm) après 24 et 48 heures d'incubation. La couleur ou la présence de fluorescence ont été notées. Les microorganismes étudiés étaient : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* et *Candida albicans*. Les résultats sont présentés dans le tableau I ci-après :

- 11 -

TABLEAU I

| Souches | | L-Ala-AMC | L-Ala-BIA | L-Leu-AMC | L-Leu-BIA |
|-----------------------|------|-------------------|----------------|-----------------|-----------|
| <i>E. coli</i> | 24 H | Fluo ¹ | — ² | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — | Fluo | — |
| <i>K. pneumoniae</i> | 24 H | Fluo | — | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — | Fluo | — |
| <i>C. freundii</i> | 24 H | Fluo | — | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — | Fluo | — |
| <i>P. aeruginosa</i> | 24 H | Fluo | — | — | — |
| | 48 H | Fluo | — | Fluo | — |
| <i>S. agalactiae</i> | 24 H | — | — | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — | Fluo | — |
| <i>E. faecium</i> | 24 H | — | — | — | — |
| | 48 H | Fluo | — | Fluo | — |
| <i>S. pyogenes</i> | 24 H | — | — | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — | Fluo | — |
| <i>S. epidermidis</i> | 24 H | — | — | — | — |
| | 48 H | — | — | — | — |
| <i>C. albicans</i> | 24 H | — | — | NT ³ | NT |
| | 48 H | Fluo | — | NT | NT |

1 : Fluo = Fluorescence

5 2 : — = absence de fluorescence et/ou absence de coloration

3 : NT = non testé

Le milieu utilisé dans cet exemple permet de mettre en évidence les activités L-Alanine-aminopeptidase et 10 L-Leucine-aminopeptidase avec les réactifs L-Ala-AMC et L-Leu-AMC, respectivement, mais lorsqu'on utilise la L-Ala-BIA, et la L-Leu-BIA aucune hydrolyse n'est détectée.

- 12 -

Exemple 2

Dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,3 à 25°C on ajoute soit de la L-Leu-BIA soit de la L-Leu-AMC, à des concentrations de 400 mg/l. Les milieux obtenus ont été répartis dans les puits de plaques de microtitration etensemencés avec des suspensions de microorganismes. Les plaques ont été mises en incubation 24 heures à 37°C. Les puits ont été examinés visuellement à la lumière ambiante et 10 sous lampe U.V., comme précédemment. Après 24 et 48 heures d'incubation, la couleur ou la présence de fluorescence ont été notées. Les résultats sont présentés dans le tableau II ci-après :

15

TABLEAU II

| Souches | | L-Leu-AMC | L-Leu-BIA |
|-----------------------|------|-------------------|----------------|
| <i>E. coli</i> | 24 H | Fluo ¹ | — ² |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>K. pneumoniae</i> | 24 H | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>C. freundii</i> | 24 H | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>P. aeruginosa</i> | 24 H | — | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>S. agalactiae</i> | 24 H | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>E. faecium</i> | 24 H | — | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>S. pyogenes</i> | 24 H | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>S. epidermidis</i> | 24 H | — | — |
| | 48 H | — | — |

¹ : Fluo = Fluorescence

² : — = absence de fluorescence et/ou
absence de coloration

- 13 -

Ainsi, avec le milieu utilisé dans cet exemple, il est possible de mettre en évidence l'activité de L-Leucine-aminopeptidase avec L-Leu-AMC, mais lorsqu'on utilise la L-Leu-BIA aucune hydrolyse n'est détectée.

5

Exemple 3

Le milieu de culture contient, outre de l'eau :

- Extrait de levure * 6 g/l
 - 10 - Peptone de gélatine ** 5 g/l
 - NaCl 8 g/l
 - Na₂CO₃ 0,1 g/l
 - Agar 13 g/l
- * commercialisé par BIO MERIEUX
- 15 ** BIO-GELYTONE commercialisé par BIO MERIEUX

A ce milieu on ajoute soit de la L-Ala-BIA, soit de la L-Leu-BIA, soit de la L-Ala-AMC, soit de la L-Leu-AMC, à des concentrations de 200 mg/l. On ensemence les différents milieux obtenus, répartis en boîtes de Petri, avec les mêmes microorganismes que ceux utilisés dans l'exemple 1. Les boîtes sont mises en incubation à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement à la lumière ambiante et sous lampe U.V. (longueur d'onde = 365 nm) après 24 et 48 heures d'incubation. La couleur ou la présence de fluorescence ont été notées. Les résultats sont présentés dans le tableau III ci-après :

- 14 -

TABLEAU III

| Souches | | L-Ala-AMC | L-Ala-BIA | L-Leu-AMC | L-Leu-BIA |
|---------------------------------------|------|-------------------|-----------|-----------------|----------------|
| <i>E. coli</i> Gram négatif | 24 H | Fluo ¹ | Brun | Fluo | — ² |
| | 48 H | Fluo | Brun | Fluo | Brun |
| <i>K. pneumoniae</i> Gram négatif | 24 H | Fluo | Brun | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | Brun | Fluo | Brun |
| <i>C. freundii</i> Gram négatif | 24 H | Fluo | Brun | Fluo | Brun |
| | 48 H | Fluo | Brun | Fluo | Brun |
| <i>P. aeruginosa</i> Gram négatif | 24 H | Fluo | Brun | — | — |
| | 48 H | Fluo | Brun | Fluo | Brun |
| <i>S. agalactiae</i> Gram positif | 24 H | — | — | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | Brun | Fluo | — |
| <i>E. faecium</i> Gram positif | 24 H | — | — | — | — |
| | 48 H | Fluo | Brun | Fluo | — |
| <i>S. pyogenes</i> Gram positif | 24 H | — | — | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | Brun | Fluo | — |
| <i>S. epidermidis</i> Gram positif | 24 H | — | — | — | — |
| | 48 H | — | — | — | — |
| <i>C. albicans</i> | 24 H | — | — | NT ³ | NT |
| | 48 H | Fluo | Brun | NT | NT |

1 : Fluo = Fluorescence

5 2 : — = absence de fluorescence et/ou absence de coloration

3 : NT = non testé

Le milieu utilisé dans cet exemple permet de mettre en évidence les activités de L-Alanine-aminopeptidase et de 10 L-Leucine-aminopeptidase avec la L-Ala-AMC et la L-Leu-AMC, respectivement, ainsi qu'avec la L-Ala-BIA et la L-Leu-BIA. Ces deux derniers substrats donnent cependant des réactions parfois plus tardives. En revanche, ils permettent de distinguer les bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram 15 positif. En effet :

- après 24 heures d'incubation avec L-Ala-BIA, les bactéries Gram positif ne donnent pas de coloration, alors que les bactéries Gram négatif donnent une coloration brune ;

- 15 -

- et après 48 heures avec la L-Leu-BIA : les bactéries Gram positif ne donnent pas de coloration, alors que les bactéries Gram négatif donnent une coloration brune.

5 Exemple 4

Dans le milieu de l'exemple 3, on a ajouté soit de la L-Leu-BIA soit de la L-Ala-BIA, seules ou en combinaison avec soit du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucoside (X-Glu), soit du 6-chloro-3-indolyl- β -D-glucoside (Z-Glu), soit du 4-méthylumbel-liféryl- β -D-glucoside (MuG1) soit du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-acétate (X-Ac).

Les concentrations de ces différents substrats sont les suivantes :

- 15 - L-Leu-BIA : 200 mg/l
 - L-Ala-BIA : 200 mg/l
 - X-Glu : 200 mg/l
 - Z-Glu : 200 mg/l
 - MuG1 : 200 mg/l

20

On ensemence ces différents milieux répartis dans des boîtes de Petri avec des microorganismes. Les souches étudiées sont les mêmes qu'aux exemples précédents. Les boîtes ont été mises en incubation à 37°C pendant 48 heures, 25 et les colonies formées ont été examinées visuellement à la lumière ambiante et sous lampe U.V. (longueur d'onde = 365 nm). Les résultats d'observation des couleurs des colonies obtenues après 24 et 48 heures d'incubation sont présentés dans le tableau IV :

30

- 16 -

TABLEAU IV

| | | L-Ala-BIA | | | | | L-Leu-BIA | | | | |
|--------------------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | — | X-Glu | Z-Glu | MUGI | X-Ac | — | X-Glu | Z-Glu | MUGI | X-Ac |
| Souches | N° du milieu | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <i>E. coli</i> Gram négatif | 24 H | Brun | Brun | Brun | Brun | Brun | — | — | — | — | — |
| | 48 H | Brun | Gris-Brun |
| <i>K. pneumoniae</i> Gram négatif | 24 H | Brun | Gris | Gris-Rose | Brun+Fluo | Gris | — | Bleu | Gris-Rose | Fluo | Gris-Brun |
| | 48 H | Brun | Gris | Gris-Rose | Brun+Fluo | Gris-Brun | Brun | Bleu-Gris | Gris-Rose | Brun+Fluo | Gris-Brun |
| <i>C. freundii</i> Gram négatif | 24 H | Brun | Gris | Gris-Rose | Brun+Fluo | Gris | Brun | Gris | Gris-Rose | Brun+Fluo | Gris-Brun |
| | 48 H | Brun | Gris | Gris-Rose | Brun+Fluo | Brun | Brun | Gris | Gris-Rose | Brun+Fluo | Gris-Brun |
| <i>P. aeruginosa</i> Gram négatif | 24 H | Brun | Brun | Brun | Brun | Gris-Brun | — | — | — | — | Gris |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Brun | Gris-Brun | Brun | Brun | Brun | Brun | Gris-Brun |
| <i>S. agalactiae</i> | 24 H | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Brun | Gris | — | — | — | — | — |
| <i>E. faecium</i> | 24 H | — | Bleu | Rose | Fluo | Bleu | — | Bleu | Rose | Fluo | Bleu |
| | 48 H | Brun | Gris-Bleu | Rose-Gris | Brun+Fluo | Gris-Bleu | — | Bleu | Rose | Fluo | Gris-Bleu |
| <i>S. pyogenes</i> | 24 H | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Brun | Gris-Bleu | — | — | — | — | — |
| <i>S. epidermidis</i> | 24 H | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 48 H | — | — | — | — | Turquoise | — | — | — | — | — |

Sur les milieux 2, 3 et 4 il est possible de distinguer après 24 heures d'incubation les *Enterococcus* (*E. faecium*) qui seuls donnent une coloration autre que brune ou grise. Les milieux 2, 3 et 4 permettent aussi, après 24 heures de culture, de distinguer les bactéries Gram positif, qui présentent soit une absence de coloration soit une coloration autre que brune ou grise. Les milieux 7, 8 et 9 permettent des distinctions similaires, mais après 48 heures d'incubation. Sur le milieu 5 après 48 heures d'incubation seul *S. epidermidis* donne des colonies de couleur turquoise.

- 17 -

les autres bactéries donnant des colonies brunes à gris-bleu.

On précise que lorsque les substrats ci-après sont présents seuls dans le milieu réactionnel, la présence d'une osidase et l'hydrolyse résultante du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-gluco-side (X-Glu) entraîne l'apparition d'une couleur bleu turquoise, l'hydrolyse du 6-chloro-3-indolyl-β-D-glucoside (Z-Glu) entraîne l'apparition d'une couleur rose-pourpre. L'hydrolyse du 4-méthyl-umbelliféryl-β-D-glucoside (MUG1) entraîne l'apparition d'une fluorescence bleue sous lampe U.V. (longueur d'onde = 365 nm) ; et que, en présence d'une estérase, l'hydrolyse résultante du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-acétate (X-Ac) entraîne l'apparition d'une couleur bleu turquoise.

15 Exemple 5

Le milieu de culture contient, outre de l'eau :

- Extrait de levure * 6 g/l
 - Peptone de gélatine ** 5 g/l
 - 20 - NaCl 8 g/l
 - Na₂CO₃ 0,1 g/l
- * commercialisé par BIO MERIEUX
** BIO-GELYTONE commercialisé par BIO MERIEUX

25 A ce milieu, on ajoute soit de la L-Leu-BIA soit de la L-Ala-BIA, seules, ou en combinaison entre elles, ou en combinaison avec du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-acétate (X-Ac).

- 18 -

Les concentrations de ces différents substrats sont les suivantes :

- L-Leu-BIA : 300 mg/l
- L-Ala-BIA : 300 mg/l
- 5 - X-Ac : 200 mg/l

Les milieux obtenus ont été répartis dans des plaques de microtitration etensemencés avec des suspensions de microorganismes, comme précédemment. Les plaques ont été
 10 mises en incubation 48 heures à 37°C. Les couleurs des puits obtenues après 24 et 48 heures d'incubation sont présentées dans le tableau V :

15

TABLEAU V

| | | L-Leu-BIA | L-Ala-BIA | L-Ala-BIA + L-Leu-BIA | L-Ala-BIA + X-Ac |
|-----------------------|--------------|-----------|-----------|-----------------------|------------------|
| Souches | N° du milieu | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>E. coli</i> | 24 H | — | Brun | Brun | Gris |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Gris |
| <i>K. pneumoniae</i> | 24 H | Brun | Brun | Brun | Gris |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Gris |
| <i>C. freundii</i> | 24 H | Brun | Brun | Brun | Gris |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Gris |
| <i>P. aeruginosa</i> | 24 H | Brun | Brun | Brun | Gris |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Gris |
| <i>S. agalactiae</i> | 24 H | — | — | Brun | Gris-Bleu |
| | 48 H | — | Brun | Brun | Gris-Bleu |
| <i>E. faecium</i> | 24 H | — | — | Brun | Gris-Bleu |
| | 48 H | — | — | Brun | Gris-Bleu |
| <i>S. pyogenes</i> | 24 H | — | — | Brun | Gris-Bleu |
| | 48 H | Brun | Brun | Brun | Gris-Brun |
| <i>S. epidermidis</i> | 24 H | — | — | — | Turquoise |
| | 48 H | — | — | — | Turquoise |

- 19 -

On voit qu'avec les milieux 3 et 4 il est possible de distinguer *S. epidermidis* des autres bactéries. Avec le milieu 1 il est possible de différencier des bactéries à Gram négatif de celles à Gram positif (sauf *S. pyogenes*) après 48 heures d'incubation. Le milieu 2 permet la différenciation des bactéries Gram positif et Gram négatif après 24 heures d'incubation.

Exemple 6

10

Le milieu de culture contient, outre de l'eau :

15

- Extrait de viande de boeuf * 3 g/l
- Peptone de gélatine ** 5 g/l
- NaCl 8 g/l
- Agar 15 g/l

* commercialisé par BIO MERIEUX

** BIO-GELYTONE (BIO MERIEUX)

20

On ajoute à ce milieu soit de la L-Ala-BIA, soit de la L-Ala-AMC, à des concentrations de 300 mg/l et de 200 mg/l, respectivement. On ensemence les différents milieux obtenus répartis en boîtes de Petri, avec des microorganismes. Les boîtes sont mises à incubation à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement à la lumière ambiante et sous lampe U.V. comme précédemment, après 24 et 48 heures d'incubation. La couleur ou la présence de fluorescence ont été notées. Les résultats sont présentés dans le tableau VI ci-après.

- 20 -

TABLEAU VI

| Souches | | L-Ala-AMC | L-Ala-BIA |
|-----------------------|------|-------------------|-----------|
| <i>E. coli</i> | 24 H | Fluo ¹ | Brun |
| | 48 H | Fluo | Brun |
| <i>K. pneumoniae</i> | 24 H | Fluo | Brun |
| | 48 H | Fluo | Brun |
| <i>C. freundii</i> | 24 H | Fluo | Brun |
| | 48 H | Fluo | Brun |
| <i>P. aeruginosa</i> | 24 H | Fluo | — |
| | 48 H | Fluo | Brun |
| <i>S. agalactiae</i> | 24 H | — ² | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>E. faecium</i> | 24 H | — | — |
| | 48 H | Fluo | — |
| <i>S. pyogenes</i> | 24 H | — | — |
| | 48 H | Fluo | Brun |
| <i>S. epidermidis</i> | 24 H | — | — |
| | 48 H | — | — |
| <i>C. albicans</i> | 24 H | — | — |
| | 48 H | Fluo | Brun |

¹ : Fluo = Fluorescence

² : — = absence de fluorescence et/ou absence de coloration

Avec le milieu utilisé dans cet exemple, il est donc possible de mettre en évidence l'activité de L-alanine-aminopeptidase avec L-Ala-AMC ainsi qu'avec L-Ala-BIA

- 21 -

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un composé de formule :



5 dans laquelle X représente un groupe 5-bromoindole-3-yile et R représente le reste acyle d'un acide aminé choisi parmi la leucine et lalanine,
comme agent révélateur permettant de mettre en évidence, par formation d'un produit coloré, une activité de peptidase dans
10 une culture de microorganismes.

2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle R représente un reste acyle de L-Leu, L-Ala ou D-Ala.

3. Utilisation selon l'une quelconque des
15 revendications précédentes, dans laquelle ladite culture est réalisée en milieu gélifié.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans laquelle ladite culture est réalisée en milieu liquide.

20 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle en outre on ajoute à ladite culture au moins un autre agent révélateur permettant de mettre en évidence, par formation d'un produit coloré ou fluorescent, une activité enzymatique différente de celle mise en évidence conformément à la revendication 1.

30 6. Procédé de mise en évidence d'une activité de peptidase dans une culture de microorganisme, dans lequel on ajoute au milieu de culture desdits microorganismes un agent révélateur permettant de mettre en évidence ladite activité par formation d'un produit coloré, caractérisé par le fait que ledit agent révélateur comprend au moins un composé de

- 22 -

formule :

X-NH-R

dans laquelle X représente un groupe 5-bromoindole-3-yle et R représente le reste acyle d'un acide aminé choisi parmi la
5 leucine et l'alanine.

7. Milieu de culture de microorganismes contenant, outre les ingrédients nécessaires à la culture desdits microorganismes, au moins un composé de formule :

X-NH-R

10 dans laquelle X représente un groupe 5-bromoindole-3-yle et R représente le reste acyle d'un acide aminé choisi parmi la leucine et l'alanine.

8. Milieu de culture selon la revendication 7, contenant de 25 à 2000 mg/l dudit composé.

15 9. Milieu de culture selon la revendication 7 ou 8, caractérisé par le fait qu'il s'agit d'un milieu gélifié.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte nai Application No
PCT/FR 97/01415

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/04 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A | Z. LOJDA ET AL.: "The histochemical demonstration of aminopeptidase with Bromoindolyl Leucinamide." HISTOCHEMISTRY, vol. 43, 1975, pages 355-366, XP000671121 cited in the application --- J. RATH ET AL.: "Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the caribbean sea." MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES, vol. 102, 1993, pages 89-96, XP000671132 see page 91 --- | 1 |
| A | --- | -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 1997

Date of mailing of the international search report

05.11.97

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Cartagena y Abella, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/01415

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | WO 92 12259 A (BIO MERIEUX) 23 July 1992 cited in the application & FR 2 671 100 A --- | |
| A | WO 90 12888 A (BIOCONTROL SYSTEMS INCORPORATED) 1 November 1990 ----- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte
rnal Application No

PCT/FR 97/01415

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| WO 9212259 A | 23-07-92 | FR 2671100 A AT 135051 T DE 69117744 D DE 69117744 T EP 0516817 A ES 2084345 T US 5434056 A | 03-07-92 15-03-96 11-04-96 18-07-96 09-12-92 01-05-96 18-07-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO 9012888 A | 01-11-90 | AU 639237 B AU 5655290 A CA 2062753 A DE 69020555 D DE 69020555 T EP 0470172 A JP 4504802 T US 5403721 A | 22-07-93 16-11-90 28-10-90 03-08-95 02-11-95 12-02-92 27-08-92 04-04-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No
PCT/FR 97/01415

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/04 C12Q1/37

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | Z. LOJDA ET AL.: "The histochemical demonstration of aminopeptidase with Bromoindoly! Leucinamide." HISTOCHEMISTRY, vol. 43, 1975, pages 355-366, XP000671121 cité dans la demande --- J. RATH ET AL.: "Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the caribbean sea." MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES, vol. 102, 1993, pages 89-96, XP000671132 voir page 91 --- | |
| A | | 1 |

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05. 11. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cartagena y Abella, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No
PCT/FR 97/01415

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | WO 92 12259 A (BIO MERIEUX) 23 juillet 1992 cité dans la demande & FR 2 671 100 A --- | |
| A | WO 90 12888 A (BIOCONTROL SYSTEMS INCORPORATED) 1 novembre 1990 ----- | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der Internationale No

PCT/FR 97/01415

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|--|
| WO 9212259 A | 23-07-92 | FR 2671100 A AT 135051 T DE 69117744 D DE 69117744 T EP 0516817 A ES 2084345 T US 5434056 A | 03-07-92 15-03-96 11-04-96 18-07-96 09-12-92 01-05-96 18-07-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO 9012888 A | 01-11-90 | AU 639237 B AU 5655290 A CA 2062753 A DE 69020555 D DE 69020555 T EP 0470172 A JP 4504802 T US 5403721 A | 22-07-93 16-11-90 28-10-90 03-08-95 02-11-95 12-02-92 27-08-92 04-04-95 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |